

选择性 β 肾上腺素受体激动剂对人滑膜细胞增殖能力的影响

魏巍, 吴华勋, 付静静, 袁平凡, 魏伟

摘要 目的 观察 β -肾上腺素受体(AR)激动药对人成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖的作用,探讨 β -AR 信号对人 FLS 功能的影响。方法 组织块培养法培养人 FLS; 使用肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 作为刺激剂,MTT 法分别检测 β_1 -AR 选择性激动剂多巴酚丁胺和 β_2 -AR 选择性激动剂沙丁胺醇对人 FLS 增殖作用的影响,并计算增殖抑制率; 使用沙丁胺醇 + β_2 -AR 选择性拮抗剂 ICI 118551 观察其对 FLS 增殖功能的影响; Western blot 法检测人 FLS β -AR、G 蛋白偶联受体激酶 2(GRK2) 和 β 抑制蛋白 2(β -arrestin2) 胞膜蛋白的表达水平。结果 TNF- α 可以显著促进人 FLS 的增殖; β_2 -AR 激动剂沙丁胺醇能明显抑制 FLS 的增殖,其拮抗剂 ICI 118551 能显著拮抗沙丁胺醇的作用; β_1 -AR 选择性激动剂多巴酚丁胺对 FLS 的增殖无显著影响; TNF- α 和沙丁胺醇均能显著降低 β_2 -AR 胞膜表达,上调 GRK2、 β -arrestin2 的胞膜表达。结论 β_2 -AR 信号的激活可以抑制 FLS 增殖; TNF- α 和沙丁胺醇可以使 GRK2、 β -arrestin2 的胞膜表达增加, β_2 -AR 胞膜表达下降。

关键词 肾上腺素受体; 成纤维样滑膜细胞; 沙丁胺醇; 增殖

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0978-04

肾上腺素受体(adrenergic receptor, AR)作为神经免疫调节的关键受体,可能参与了类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的发生、发展过程^[1]。AR 属于 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族,AR 分为 α_1 -AR、 α_2 -AR、 β -AR。 β -AR 分为 3 个亚型,即 β_1 -AR、 β_2 -AR、 β_3 -AR^[2]。其中 β_2 -AR 在炎症反应细胞因子网络中发挥抗炎作用,可以抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)产生、抑制白细胞黏附、降低毛细血管通透性等^[3-4]。 β -AR 介导的信号通路可能受到 G

蛋白偶联受体激酶 2(G-protein-coupled receptor kinases, GRK2)和 β 抑制蛋白 2(β -arrestin2)的调节^[5]。 β -AR 活化后会被 GRK2 磷酸化,而后 β -arrestin 2 转移至细胞膜与磷酸化的受体结合,使该受体与 G 蛋白脱偶联,从而促进 β -AR 内化和脱敏^[6]。在 β -AR 信号转导中,GRK2/ β -arrestin2 是 β -AR 信号转导的负性调控分子,直接影响下游信号分子的效应^[7]。该研究通过观察 β_1 -AR 选择性激动剂多巴酚丁胺和 β_2 -AR 选择性激动剂沙丁胺醇及其选择性的受体拮抗剂对人成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)的增殖功能等的影响,及 β -AR 信号在人 FLS 中的变化,探讨 β -AR 信号对人 FLS 的调节作用及部分可能机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 8 月~2013 年 8 月在安徽医科大学第一附属医院行膝关节置换及关节镜术中所取的 10 例正常关节滑膜组织。全部来源于膝关节半月板损伤患者,男 6 例,女 4 例;年龄 18~37(23 $\pm$ 5.8)岁,经诊断无其他关节病变,取正常滑膜组织,试验得到所有对象的知情同意。

1.2 试剂 β_1 -AR 选择性激动剂多巴酚丁胺购自浙江瑞新药业股份有限公司; β_2 -AR 选择性激动剂沙丁胺醇购自上海禾丰制药有限公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自美国 Hyclone 公司; β_2 -AR 选择性拮抗剂 ICI 118551、MTT 购自美国 Sigma 公司,MTT 以 PBS 配制成所需浓度,过滤除菌,现用现配; 兔源性抗 β_1 -AR 抗体和兔源性抗 β_2 -AR 抗体购自美国 abcam 公司; 兔源性抗 GRK2 抗体和兔源性抗 β -arrestin2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; TNF- α 购自上海达科为生物制品有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 滑膜细胞分离、培养 采用滑膜细胞的组织块培养法^[8]: 将前述收取的滑膜组织放入有 PBS 的无菌瓶内,在超净台内弃 PBS,用 D-Hank's 液(无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 含青霉素 200 mg/L、链霉素 200 mg/L)反复冲洗后剪成 1~2 mm² 小块,用弯头吸管吸取

2015-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81173075, 81330081, 81302784); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1301042098)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032

作者简介: 魏巍,女,硕士研究生;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

均匀排列于培养瓶(预先用含 20% FCS 的 DMEM 培养液湿润)的底壁,瓶底朝上,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 3 h,使其贴壁。轻轻翻转培养瓶,使培养液刚刚覆盖组织块,每隔 2~3 d 换 1 次培养液,观察到有大量成纤维细胞长出后轻轻去除组织块,继续培养,待细胞快长满时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并传代培养,取第 3 代细胞用于实验。

1.3.2 FLS 增殖反应的测定 采用 MTT 法检测增殖反应。人第 3 代滑膜细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 20% FCS 的 DMEM 培养液制备细胞悬液(5×10^6 个/ml),加至 96 孔培养板,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。实验分为:正常组、TNF- α (20 ng/ml) 刺激组、TNF- α + 多巴酚丁胺(10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 组、TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 组,培养 12、24、48、72 h。终止培养前 4 h 各孔加 MTT (5 g/L) 溶液 20 μ l 继续培养,培养结束后弃去上清液,加入 DMSO (100 μ l/孔),振荡 3 min 后于酶标仪 490 nm 波长处测吸光度(absorbance, A) 值。每组以复孔的均值表示其结果。根据以上实验结果,选择合适的时间、浓度,给予 β_2 -AR 选择性拮抗剂 ICI 118551 观察其对人 FLS 增殖的影响。

1.3.3 Western blot 法检测 FLS 的 β_1 -AR、 β_2 -AR、GRK2 和 β -arrestin2 胞膜蛋白的表达 取第 3 代 FLS,以每孔 1×10^6 细胞密度接种于 6 孔板中,实验分为:正常组、沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组、TNF- α (20 ng/ml) 组、TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组。培养 24 h, PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RIPA 裂解液后超声降解,提取总蛋白,100 000 r/min 离心 1 h,沉淀物为胞膜蛋白,用裂解液溶解,加入上样缓冲液煮沸变性后进行 SDS-PAEG 电泳(5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶),转膜,5% 的脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h,分别加入抗 β_1 -AR、 β_2 -AR、GRK2 或 β -arrestin2 (1 : 1 000) 抗体,内参用 β -actin 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1 : 30 000),37 °C 孵育 2 h, ECL 法显影,分析条带灰度值。实验重复 3 次,以目的条带与 β -actin 条带的灰度比值来表示蛋白相对表达量^[8]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 β -AR 选择性激动剂对 FLS 增殖能力的影响 与正常组比较, TNF- α (20 ng/ml) 可以明显促进人

FLS 的增殖能力,沙丁胺醇在 12、24、48 h 可不同程度的抑制 FLS 亢进的增殖功能,而多巴酚丁胺对 FLS 的增殖无明显影响。沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 在 24 h 有较高的增殖抑制率。见图 1、2。

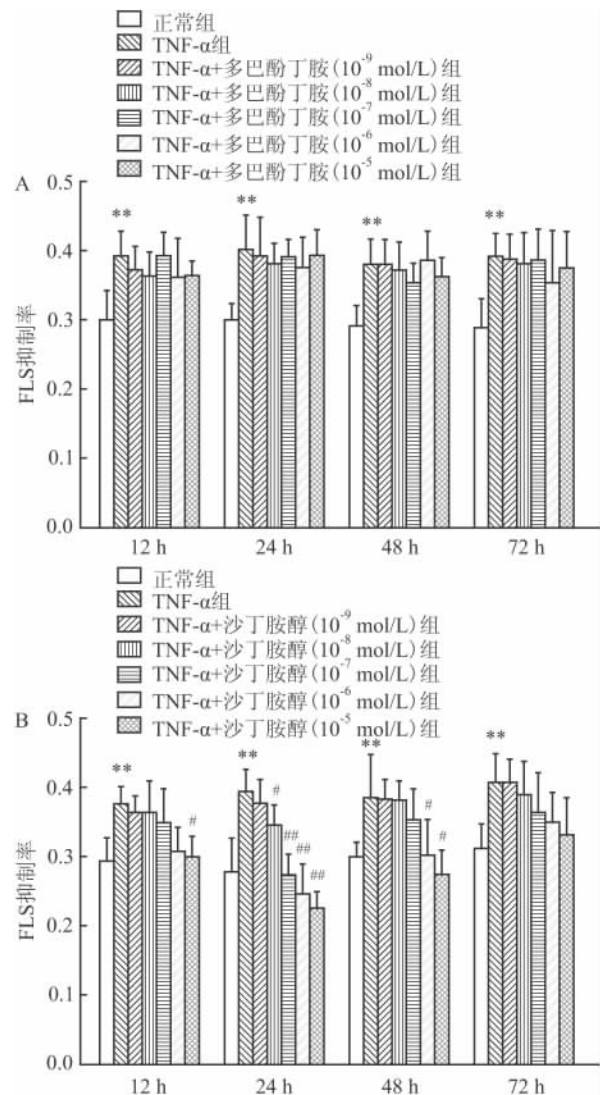


图1 β -AR 选择性激动剂对 FLS 增殖能力的影响

A: 多巴酚丁胺; B: 沙丁胺醇; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 β_2 -AR 选择性拮抗剂对人 FLS 增殖能力的影响 与正常组比较, TNF- α (20 ng/ml) 可以显著促进 FLS 的增殖 ($P = 0.004$), 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 能显著抑制 FLS 亢进的增殖能力 ($P = 0.022$), β_2 -AR 选择性拮抗剂 ICI 118551 (10^{-6} mol/L) 能显著拮抗沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 对 FLS 的抑制作用 ($P = 0.006$)。见图 3。

2.3 Western blot 法检测 FLS β_1 -AR、 β_2 -AR、GRK2、 β -arrestin2 的变化 与正常组比较, TNF- α

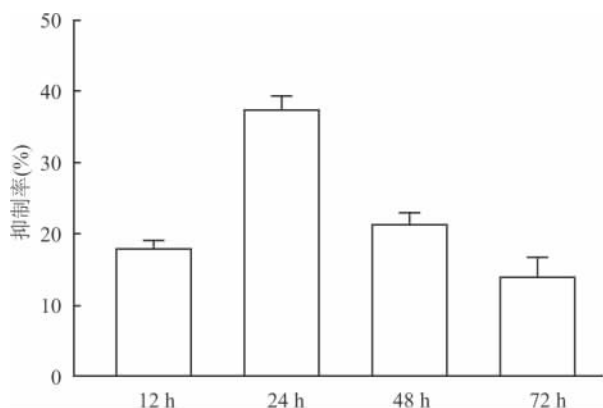


图2 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L)作用不同时间对TNF- α (20 ng/ml)刺激的FLS增殖抑制率

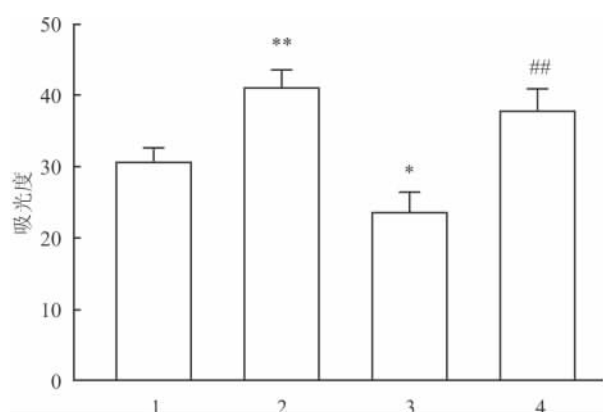


图3 β_2 -AR 选择性拮抗剂对沙丁胺醇处理的FLS增殖能力的影响

1: 正常组; 2: TNF- α 组; 3: TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组; 4: TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) + ICI 118551 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组比较: ## $P < 0.01$

(20 ng/ml) 可以显著降低胞膜中 β_2 -AR 的表达($P = 0.007$); 升高胞膜中 GRK2($P = 0.034$)、 β -arrestin2($P = 0.008$) 的表达。与 TNF- α 单独刺激组比较, TNF- α (20 ng/ml) + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组可以进一步降低胞膜中 β_2 -AR 的表达($P = 0.023$); 升高胞膜中 GRK2($P = 0.015$)、 β -arrestin2($P = 0.034$) 的表达。见图4。

3 讨论

β -AR 是一类典型的 GPCRs, 是人体内具有复杂生理功能的受体, 与许多疾病的发生密切相关, 如心血管疾病、自身免疫病等, 其功能受 GRK2 等的调节。 β_2 -AR 以激动剂依赖方式与 GRK2 结合并磷酸化, 另一蛋白家族视紫红质抑制蛋白(arrestin)与磷酸化的 β -AR 结合, 得 β -AR 与 $G_{\alpha s}$ 蛋白解偶联, 导致受体功能减退(即同源脱敏)^[14], 通过G蛋白-

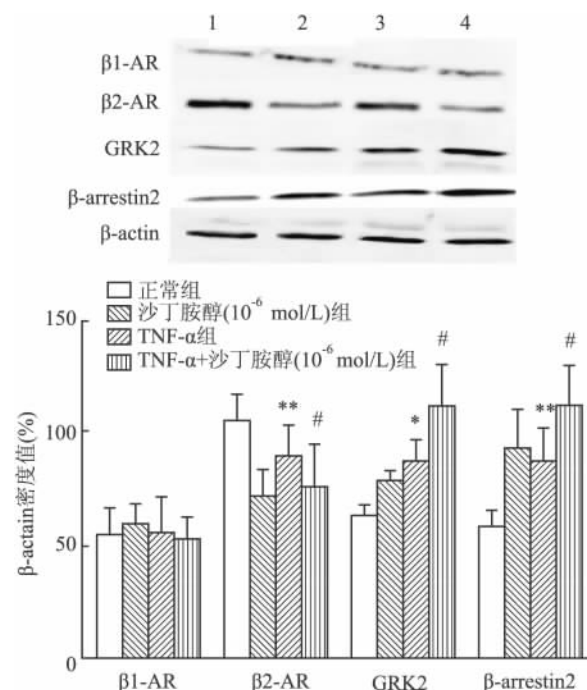


图4 FLS β -AR、GRK2、 β -arrestin2 胞膜蛋白的表达

1: 正常组; 2: 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组; 3: TNF- α 组; 4: TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.05$

AC-cAMP 信号转导通路, 启动信号转导一系列反应, 将胞外信号传达到胞内, 调节细胞的生理功能^[8]。其中 β_2 -AR 主要偶联 G_s 蛋白, 该受体的活化能激活 AC, 升高 cAMP 的水平, 进一步激活 PKA 而发挥效应, 如抑制白细胞黏附、降低毛细血管通透性等。 β_2 -AR 的激活可以抑制很多炎症反应, 如在自身免疫性心肌炎中, β_2 -AR 信号通过调节 T 细胞的功能发挥抑制作用^[11]。那么 β_2 -AR 信号是否对 FLS 的功能具有调节作用呢? 本研究结果提示 β_2 -AR 激动药可以抑制 FLS 增殖, 而 β_1 -AR 激动药对 FLS 增殖无明显影响。

TNF- α (20 ng/ml) 可以显著降低胞膜中 β_2 -AR 的表达, 升高胞膜中 GRK2、 β -arrestin2 的表达; TNF- α + 沙丁胺醇(10^{-6} mol/L) 可以进一步降低胞膜中 β_2 -AR 的表达, 升高胞膜中 GRK2、 β -arrestin2 的表达, 两者作用趋势一致, 但 TNF- α 刺激增殖, 而沙丁胺醇抑制增殖。因为沙丁胺醇是 β_2 -AR 选择性激动剂, 刺激 β_2 -AR, 升高 cAMP 的水平。可能与 cAMP 升高, 抑制滑膜细胞增殖有关。

GRK2、 β -arrestin2 是 β -AR 脱敏典型的负性调节蛋白。 β -AR 被配体激活后, 会被 GRK2 在丝/苏氨酸位点快速磷酸化, 磷酸化的 β -AR 与转移至胞

膜的 β -arrestin2 结合,使该受体与 G 蛋白脱偶联,从而促进 β -AR 的内化和脱敏,通过脱敏 β -AR,终止 G 蛋白介导的下游信号,影响 cAMP 的水平^[13]。本实验结果显示,TNF- α 活化后的 FLS 经沙丁胺醇作用后,由于脱敏作用 β_2 -AR 胞膜表达明显下降,而 β_2 -AR 负性调节蛋白 GRK2、 β -arrestin2 在胞膜中表达显著升高,提示 GRK2、 β -arrestin2 转膜的增加,导致 β_2 -AR 脱敏的增强,可能是 β_2 -AR 胞膜表达下降主要原因。

参考文献

- [1] Koopman F A, Stoof S P, Straub R H, et al. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Mol Med*, 2011, 17(9-10): 937-48.
- [2] 汪庆童,马昱琨,黄 蓓,等. 芍药苷通过调节前列腺素 E2 受体抑制大鼠成纤维滑膜细胞增殖 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 43-7.
- [3] Zhu W, Woo A Y, Zhang Y, et al. β -adrenergic receptor subtype signaling in the heart: from bench to the bedside [J]. *Curr Top Membr*, 2011, 67: 191-204.
- [4] Chottová D M, Slavíková J. Adrenergic regulation of the mammalian heart [J]. *Cesk Fysiol*, 2011, 60(1): 14-9.
- [5] Mishima K, Otani H, Tanabe T, et al. Molecular mechanisms for α_2 -adrenoceptor-mediated regulation of synovial cell populations [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 85(3): 214-26.
- [6] Homan K T, Glukhova A, Tesmer J J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by phospholipids [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(1): 39-46.
- [7] Lymperopoulos A. GRK2 and β -arrestins in cardiovascular disease: Something old, something new [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2011, 1(2): 126-37.
- [8] Han S O, Kommaddi R P, Shenoy S K. Distinct roles for β -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β_2 adrenergic receptor trafficking [J]. *EMBO Rep*, 2013, 14(2): 164-71.
- [9] Morris A J, Malbon C C. Physiological regulation of G protein-linked signaling [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1347-430.
- [10] Zhao W, Tong T, Wang L, et al. Chicken type II collagen induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes by enhancing β_2 -adrenergic receptor desensitization in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(1): 12-8.
- [11] Zhang P, He X, Tan J, et al. β -arrestin2 mediates β_2 adrenergic receptor signaling inducing prostate cancer cell progression [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(6): 1471-7.
- [12] 赵 伟,童 彤,马 勇,等. 鸡 II 型胶原对胶原性关节炎大鼠肠系膜淋巴结 β_2 肾上腺素受体脱敏的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(3): 249-53.

The effects of the selective β -adrenergic receptor agonists on the ability of human synovial cell proliferation

Wei Wei, Wu Huaxun, Fu Jingjing, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry, Hefei 230032*)

Abstract Objective To observe the function of β -adrenergic receptor (β -AR) agonists on human fibroblasts synovial cells (FLS) proliferation and explore the effect of β -AR signaling on FLS function. **Methods** Tissue culturing method cultured human FLS; using TNF- α as a stimulant; MTT method was used to detect the effect of β_1 -AR selective agonist dobutamine and β_2 -AR selective agonist salbutamol on the proliferation of human FLS, and calculate the proliferation inhibition rate. β_2 -AR selective antagonist ICI 118551 was used to observe the effect on FLS proliferation; Western blot method could detect cell membrane protein expression level belonged to FLS β -AR, GRK2 and β -arrestin2 on human. **Results** TNF- α could significantly promote the proliferation of FLS on human, β_2 -AR agonist salbutamol could significantly inhibit the proliferation of FLS, and its antagonist ICI 118551 could significantly inhibit salbutamol action. β_1 -AR selective agonist dobutamine had no significant effect on the proliferation of FLS; TNF- α and salbutamol significantly decreased β_2 -AR expression of cell membrane, and up-regulated GRK2 and β -arrestin2 expression in cell membrane. **Conclusion** The activation of β_2 -AR signal can inhibit the proliferation of FLS; TNF- α and salbutamol can increase the expression of GRK2, β -arrestin2, and decrease the expression of β_2 -AR in cell membrane.

Key words adrenergic receptor; fibroblast-like synovial cells; albuterol sulfate; desensitization